

学校编码: 10384

分类号__密级__

学 号: 32320120153952

UDC__

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

Rab7 磷酸化修饰及其功能研究

Mechanistic and Functional Studies of Rab7

Phosphorylation

林晓思

指导教师姓名: 王 团 老 教授

洪 万 进 教授

专 业 名 称: 化 学 生 物 学

论文提交日期: 2016 年 7 月

论文答辩时间: 2016 年 8 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	i
Abstract.....	ii
第一章 前言.....	1
1.1 Rab 蛋白简介.....	1
1.1.1 Ras 超家族蛋白	1
1.1.2 Rab 家族蛋白	2
1.2 Rab7 的结构和功能.....	4
1.2.1 Rab7 的结构	4
1.2.2 Rab7 参与的囊泡运输过程	5
1.3 Rab7 的上游调控因子和下游效应因子.....	10
1.3.1 Rab7 的上游调控因子	11
1.3.2 Rab7 的下游效应因子	11
1.4 Rab7 与疾病.....	14
1.4.1 Rab7 与神经退行性疾病	14
1.4.2 Rab7 与肿瘤	17
1.5 Src 简介.....	19
1.5.1 Src 家族激酶	19
1.5.2 Src 的生物学特性及功能	20
1.6 Rab 蛋白磷酸化.....	22
1.7 立题依据与研究思路	23
第二章 材料与方法.....	26
2.1 材料.....	26
2.1.1 实验菌株、细胞、质粒和引物.....	26
2.1.2 抗体.....	29
2.1.3 主要试剂.....	30
2.1.4 常用溶液组分.....	32

2.1.5 主要仪器设备.....	34
2.2 实验方法	35
2.2.1 常用标签表达载体的构建.....	35
2.2.2 RNAi 真核细胞表达载体的构建	39
2.2.3 细胞培养.....	40
2.2.4 免疫荧光.....	42
2.2.5 His-Tagged 融合蛋白的表达和提取	42
2.2.6 His-Src 介导的 His-Rab7 体外磷酸化	43
2.2.7 免疫沉淀.....	44
2.2.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	44
2.2.9 免疫印迹.....	45
2.2.10 EGFR 降解	46
2.2.11 EGF 诱导 Rab7 磷酸化	46
2.2.12 细胞迁移试验.....	46
2.2.13 细胞侵袭试验.....	47
2.2.14 活细胞成像及分析.....	47
2.2.15 吖啶橙检测溶酶体膜完整性.....	48
2.2.16 EGFR 下游信号通路的检测	48
第三章 实验结果与分析	49
3.1 表达载体、敲低载体以及稳转细胞株的构建	49
3.2 Rab7 可被 Src 磷酸化修饰.....	51
3.2.1 Src 与 Rab7 共定位于内体/溶酶体	51
3.2.2 Rab7 可被 Src 磷酸化修饰	52
3.2.3 Src 对 Rab7 的磷酸化依赖于 Rab7 的活性	54
3.2.4 体外磷酸化实验表明 Src 可直接磷酸化 Rab7	57
3.2.5 Src 特异性磷酸化 Rab7.....	58
3.2.6 Src 家族其他成员对 Rab7 的磷酸化修饰	59
3.2.7 EGF 刺激诱导 Rab7 磷酸化	60
3.3 Rab7 磷酸化功能研究.....	70

3.3.1 Rab7 磷酸化影响 Rab7 与 RILP 相互作用	70
3.3.2 过表达 RILP 抑制 Rab7 磷酸化	71
3.3.3 Rab7 磷酸化抑制 EGFR 降解	72
3.3.4 Rab7 磷酸化维持 Akt 信号通路	73
3.4 Rab7 磷酸化的其他功能研究	75
3.4.1 Rab7 磷酸化对内体运动的影响	75
3.4.2 Rab7 磷酸化对其亚细胞定位的影响	81
3.4.3 Rab7 磷酸化对晚期内体/溶酶体膜稳定性的影响	82
3.4.4 Rab7 磷酸化对细胞迁移和侵袭的影响	85
第四章 讨论	89
4.1 Rab7 Y183 残基的磷酸化与去磷酸化的平衡	89
4.2 Rab7 的磷酸化不会改变其晚期内体/溶酶体定位	90
4.3 Rab7 活性通过影响其晚期内体/溶酶体定位而影响其磷酸化水平	90
4.4 Rab7 与 SFKs 的双向选择	91
4.5 EGF 诱导 Rab7 磷酸化可能最早起始于早期内体	91
4.6 EGF 诱导 Rab7 磷酸化的可能机制	92
4.7 Rab7 磷酸化的生理功能	94
4.8 结论	96
参考文献	98
附录	111
致谢	112

Table of Contents

Abstract in Chinese	i
Abstract in English	ii
Chapter1 Preface	1
1.1 Introduction of Rab protein	1
1.1.1 Ras superfamily protein.....	1
1.1.2 Rab family protein.....	2
1.2 Structure and Function of Rab7	4
1.2.1 Structure of Rab7.....	4
1.2.2 Vesicular trafficking regulated by Rab7.....	5
1.3 Upstream regulators and downstream effectors of Rab7	10
1.3.1 Upstream regulators of Rab7.....	11
1.3.2 Downstream effectors of Rab7.....	11
1.4 Rab7 and disease	14
1.4.1 Rab7 and neurodegeneration disease.....	14
1.4.2 Rab7 and cancer.....	17
1.5 Introduction of Src	19
1.5.1 Src family kinases.....	19
1.5.2 Biological characteristics and function of Src.....	20
1.6 Phosphorylation of Rab proteins	22
1.7 Basis and plan of the research	23
Chapter2 Materials and Methods	26
2.1 Materials	26
2.1.1 The stains, cells, plasmids and primers.....	26
2.1.2 Antibodies.....	29
2.1.3 Reagents.....	30
2.1.4 Components of buffers.....	32
2.1.5 Instruments and equipments.....	34

2.2 Methods	35
2.2.1 Construction of tagged protein encoding plasmids.....	35
2.2.2 Construction of shRNA encoding plasmids.....	39
2.2.3 Cell culture.....	40
2.2.4 Immunofluorescence assay.....	42
2.2.5 Expression and purification of His-Tagged recombinant protein	42
2.2.6 In vitro phosphorylation of His-Rab7 mediated by His-Src	43
2.2.7 Immunoprecipitation.....	44
2.2.8 SDS PAGE.....	44
2.2.9 Western Blot.....	45
2.2.10 EGFR degradation.....	46
2.2.11 Rab7 phosphorylation induced by EGF	46
2.2.12 Cell migration assay.....	46
2.2.13 Cell invasion assay.....	47
2.2.14 Live cell imaging and data analysis.....	47
2.2.15 Analysis of membrane permeability by Acridine Orange Assay	48
2.2.16 Detection of EGFR downstream signals.....	48

Chapter3 Results..... 49

3.1 Constrution of plasmids and stable cells	49
3.2 Src mediates Rab7 phosphorylation	51
3.2.1 Src colocalize with Rab7 on endosome/lysosome.....	51
3.2.2 Rab7 can be phosphorylated by Src.....	52
3.2.3 The phosphorylation of Rab7 mediated by Src depends on the activity of Rab7.....	54
3.2.4 Src can directly phosphorylate Rab7 in vitro.....	57
3.2.5 Rab7 is a selective substrate of Src.....	58
3.2.6 Phosphorylation of Rab7 mediated by other members of Src family	

kinases	59
3.2.7 EGF induced Rab7 phosphorylation.....	60
3.3 Functional analysis of Rab7 phosphorylation	70
3.3.1 Rab7 phosphorylation affect its interaction with RILP....	70
3.3.2 Overexpression of RILP inhibit Rab7 phosphorylation.....	71
3.3.3 Rab7 phosphorylation delays EGFR degradation.....	72
3.3.4 Rab7 phosphorylation is required for maintenance of Akt signals	73
3.4 Other function of Rab7 phosphorylation	75
3.4.1 Effect of Rab7 phosphorylation on endosome movement.....	75
3.4.2 Effect of Rab7 phosphorylation on its subcellular localization	81
3.4.3 Effect of Rab7 phosphorylation on membrane permeability of LE/LY	82
3.4.4 Effect of Rab7 phosphorylation on cell migration and invasion	85
Chapter4 Discussion.....	89
4.1 A balance between phosphorylation and dephosphorylation on Rab7 Y183 residue.....	89
4.2 Rab7 phosphorylation has no impact on its localization on LE/LY membrane	90
4.3 The activity of Rab7 affect its phosphorylation via regulation of its own LE/LY localization	90
4.4 A dual selection between Rab7 and SFKs	91
4.5 EGF induced Rab7 phosphorylation may take place at EE stage ..	91
4.6 The possible mechanism of EGF induced Rab7 phosphorylation ..	92
4.7 Physiological function of Rab7 phosphorylation	94
4.8 Conclusion	96
Reference	98

Appendix.....	111
---------------	-----

Acknowledgement.....	112
----------------------	-----

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

Rab7 调控着从内体到溶酶体以及从内体到高尔基体的囊泡运输过程；也参与了自噬、吞噬过程；同时还调节着溶酶体及其相关细胞器的生成过程。Rab7 的功能受到各种相互作用因子的调控；Rab7 的功能异常会导致包括神经退行性疾病和肿瘤在内的多种疾病。前期实验发现 Rab7 与 Src 在早期内体和晚期内体共定位，另有报道 v-Src 可激活 Rab7,但是 Src 对 Rab7 的调节机制尚不清楚。

本研究发现 Src、Blk 等酪氨酸激酶可磷酸化修饰 Rab7，其磷酸化位点为第 183 位酪氨酸残基。体外磷酸化实验提示 Src 可以直接磷酸化 Rab7。Rab7 的磷酸化依赖于 Src 以及 Rab7 的活性。EGF 刺激可以诱导 Rab7 磷酸化，该过程依赖于晚期内体/溶酶体的酸性微环境以及 EGF 诱导的过氧化氢；并且 Src 也参与了该过程。结果提示晚期内体/溶酶体产生的活性氧自由基会破坏 Rab7 磷酸化/去磷酸化平衡，导致 Rab7 的磷酸化水平显著上调。

功能上，进一步研究表明 Rab7 磷酸化会影响 Rab7 和 RILP 的相互作用，并且抑制 EGFR 的降解过程；Rab7 Y183 磷酸化选择性地调控 EGFR 下游的 Akt 信号通路，是维持 Akt 信号水平的重要因素。结果显示，Rab7 磷酸化修饰在细胞中可能对囊泡运输和信号转导起重要调控作用。

关键词：Src；Rab7；磷酸化

Abstract

Rab7 is a key regulator of vesicular trafficking from endosome to lysosome and Golgi apparatus. It also plays a role in autophagy, phagocytosis as well as the biogenesis of LRO (lysosome related organelles). The function of Rab7 is regulated by its effectors, and dysfunction of Rab7 results in several diseases including neurodegeneration and cancer. Our previous research data shows colocalization of Rab7 and Src on both early endosome and late endosome, and v-Src is reported to activate Rab7, however the mechanism by which Src regulates Rab7 is still unknown.

In this research, we found that Src and Blk can phosphorylate Rab7. The phosphorylation site is Y183 residue of Rab7. Data from *in vitro* phosphorylation shown that Rab7 is a direct substrate of Src. The level of Rab7 phosphorylation depends on the activity of both Rab7 and Src. EGF could also induce phosphorylation of Rab7 on Y183 residue in an acidic late endosomal/lysosomal pH and H₂O₂ dependent mechanism, we further shown that Src is also involved in this process. These results indicate that the Reactive Oxygen Species produced in late endosome/lysosome would disrupt the balance of phosphorylation/dephosphorylation of Rab7 and result in an increasing level of Rab7 phosphorylation.

Functionally, the phosphorylation on Y183 has an influence on the interaction between Rab7 and RILP, and consequently, inhibits the EGFR degradation process. Our results shown that the phosphorylation of Rab7 is selectively required for sustained Akt signal, which is one of several downstream signal pathways of EGFR. To sum up, the phosphorylation of Rab7 may play an important role on both membrane trafficking and signal transduction.

Key Words: Src; Rab7; phosphorylation.

第一章 前言

在生物进化过程中,真核生物发展出了复杂的细胞内膜系统,形成各种细胞器,这些细胞器的精确分工协作,是生命活动能够正常进行的基础。因此,真核生物的蛋白质合成后,需要运输到正确的位置以行使正常的功能;而囊泡运输则是细胞内蛋白运输的主要形式。囊泡运输包括供体膜区域的货物蛋白分选、囊泡的出芽、转运、锚定以及囊泡与受体膜的融合过程,Rab 家族蛋白在囊泡运输的过程中起着重要调控作用^[1]。

1.1 Rab 蛋白简介

1.1.1 Ras 超家族蛋白

Ras 超家族蛋白是一类小 GTP 酶(small GTPase),与异源三聚体 G 蛋白的 α 亚基具有同源性,但是这类小 GTP 酶可以单独行使分子开关的功能,在细胞的信号转导过程中起着重要作用。Ras 蛋白最早发现于大鼠肉瘤病毒(Rat Sarcoma)并以此作为小 GTP 酶的代名词。单细胞真核生物裂殖酵母基因组编码的 Ras 超家族蛋白成员只有 22 个,而人类基因组编码的 Ras 超家族蛋白成员有 165 个^[2],这说明随着生物体的复杂程度增高,需要更为精细的信号转导以及蛋白运输网络,来支持这种信号和结构上的复杂性。

根据序列和功能的相似性,Ras 超家族蛋白主要可以分为 5 个亚家族,分别是 Ras、Rab、Rho、Ran 和 Arf^[3]。这些小 GTP 酶共享了一系列保守的 GDP-GTP binding motif,从 N 端起分别为:G1-GXXXXGKS/T; G2-T; G3-DXXGQ/H/T; G4-T/NKXD 和 G5- C/SAK/L/T^[4]。这些结构原件组成了一个约 20kDa、在结构和生化性质上保守的 G domain;它是 Ras 超家族蛋白、G α 以及其它 GTP 酶所共享的特征结构。这 5 个亚家族的功能有所不同,Ras 亚家族调节控制基因表达的胞质信号网络、调节细胞的增殖、分化与生存^[5]; Rho 亚家族调节微丝的组织结构、细胞周期进程以及基因表达^[6]; Ran 亚家族调控细胞核-细胞质之间的物质穿梭^[7]; Rab 和 Arf 亚家族则调节细胞内的蛋白质囊泡运输^[1,8]。

Ras 超家族蛋白对 GDP 和 GTP 有很高的亲和力,但是其本身的 GTP 酶活力以及 GDP/GTP 交换活性却不高。因此 Ras 超家族蛋白的 GDP/GTP 循环由 2 类因子来调控,鸟苷酸交换因子(Guanine-nucleotide-exchange factors,GEFs)调节

GDP/GTP 的交换过程^[9], 而 GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating proteins,GAPs) 则加速 GTP 的水解过程^[10]。

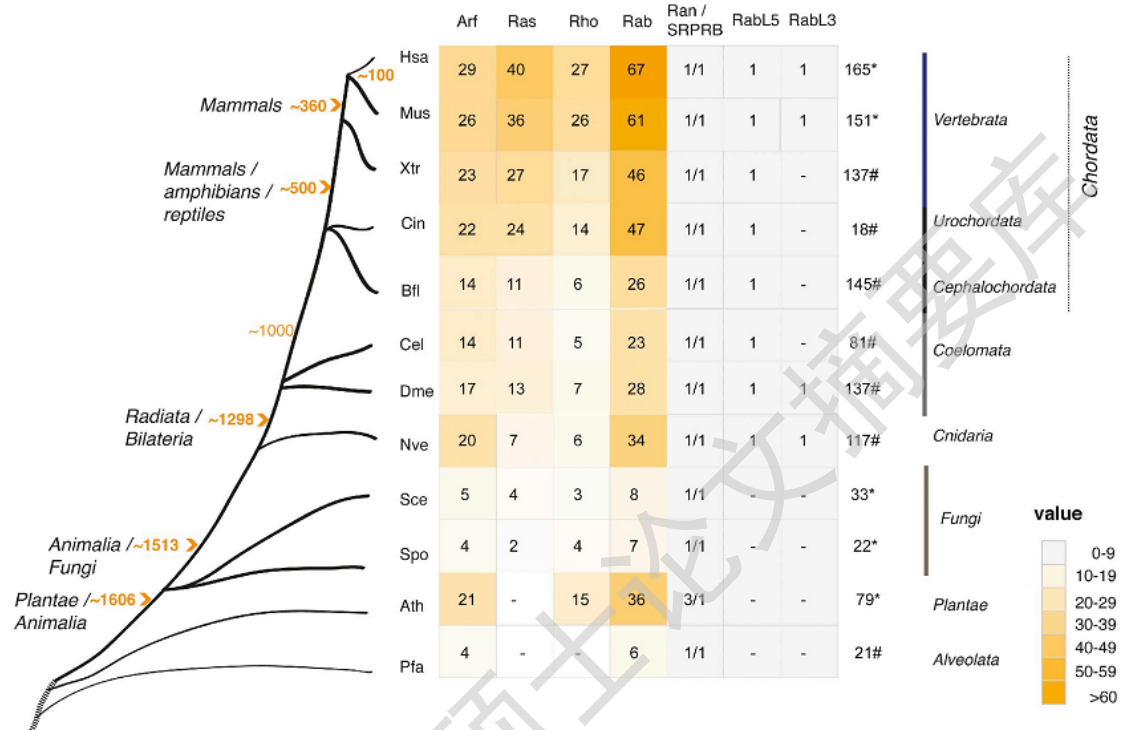


图1-1 11个物种的Ras超家族成员表

Figure1-1 Ras superfamily members in 11 species

(注: 摘自 Rojas A M 等. J Cell Biol, 2012,196(2):189-201)

1.1.2 Rab 家族蛋白

Rab 家族蛋白是 Ras 超家族里面最大的一个分支, 人类基因组编码的 Rab 蛋白有 67 种。Rab 蛋白分布于细胞内各类细胞器以及运输囊泡中间体 (如图 1-2 所示)^[11], 通过与其上游调控因子以及下游效应因子的相互作用, 调控囊泡的出芽、转运、锚定以及融合等过程。与 Ras 家族蛋白相比, Rab 家族蛋白具有长度各异的 N 端和 C 端序列; Rab 蛋白的亚细胞定位取决于其 C 端的高度可变结构域^[12, 13]。Rab 蛋白的 C 端序列以各种形式的、含有半胱氨酸残基的 motif (CC、CXC、CCX、CCXX、CCXXX 等) 结束, 这些半胱氨酸可以被 geranylgeranyltransferase type II 修饰^[14], 偶联上类异戊二烯基团, 从而易化 Rab 蛋白结合到膜上, 行使其正常功能。

随着Rab的GDP/GTP循环的进行, Rab蛋白的亚细胞定位也会发生相关变化

(如图1-3所示)。Rab蛋白合成后, geranylgeranyltransferase type II对其进行类异戊二烯化, 通过其REP (Rab escorting protein) 亚基与之结合, 将Rab蛋白运输至细胞器的膜结构上。接着GEFs催化Rab蛋白的GDP/GTP交换, 形成活性形式(GTP结合形式)的Rab蛋白从而募集效应因子; 当Rab执行完其功能后, 在GAPs的作用下, Rab将GTP水解, 生成GDP, 从而变为非活性形式(GDP结合形式), 被鸟苷酸解离抑制因子(GDP dissociation inhibitor,GDI)从膜上提取出来, 重新回到细胞质中, 而Rab-GDP复合物再次定位到膜上, 需要GDI取代因子(GDI displacement factor,GDF)将GDI从Rab-GDP释放出来^[15], 从而开启一个新的GDP/GTP循环。

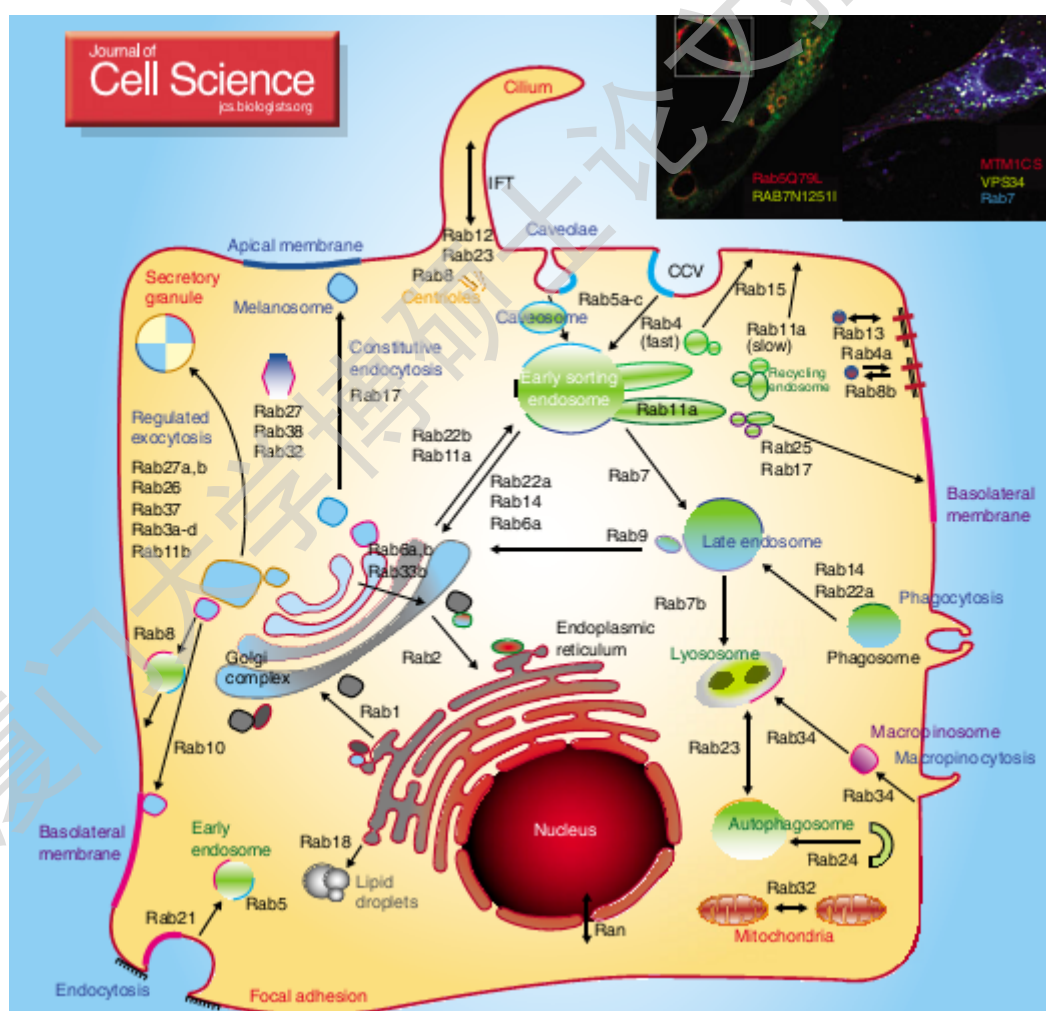


图1-2 Rab家族蛋白的亚细胞定位示意图

Figure 1-2: Schematic diagram of subcellular localization of Rab proteins

(注: 摘自 Schwartz S L 等. J Cell Sci, 2008,121(2):246-46.)

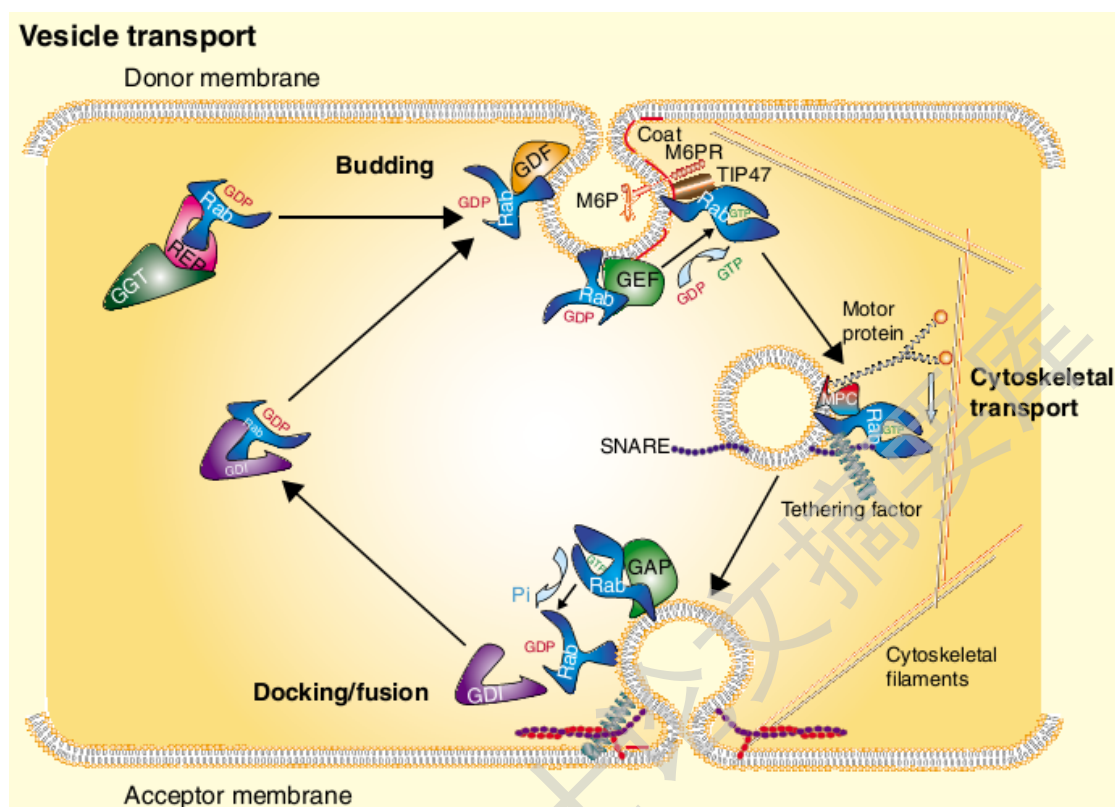


图 1-3 Rab 蛋白的 GDP/GTP 循环以及细胞亚定位的相应变化

Figure 1-3 GDP/GTP cycling of Rab proteins and corresponding subcellular distribution

(注：摘自 Schwartz S L 等. J Cell Sci, 2008,121(2):246-46.)

1.2 Rab7 的结构和功能

1.2.1 Rab7 的结构

Rab7 是 Rab 亚家族家族中最古老的成员之一，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 8 个 Rab 蛋白中的 Ypt7 即为 Rab7 的同源物^[16]。进化上的保守，也提示 Rab7 在真核生物的囊泡运输中起着不可替代的作用。

人类基因组中，RAB7 基因位于 3 号染色体上，含有 6 个外显子；其编码的 Rab7 蛋白约为 23.5kDa，含有 207 个氨基酸残基，其一级结构如图 1-4 所示：下划线标出的 motif 参与 GTP 和镁离子的结合，组成 5 个 G box。该序列还含有 4 个 RabF motif (Rab conserved sequences, Rab family motifs)、5 个 Rab SF motif (Rab subfamily specific motifs)^[17]以及 C 末端的 prenylated motif。其中 RabSF2 与 4 个 RabF motif 及其之间的序列组成了 Switch I -Switch II Region。晶体结构数据显示，在 GDP 结合形式的 Rab7 结构中，这个区域倾向于形成无规则的构

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.